

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Juli 2003 (10.07.2003)

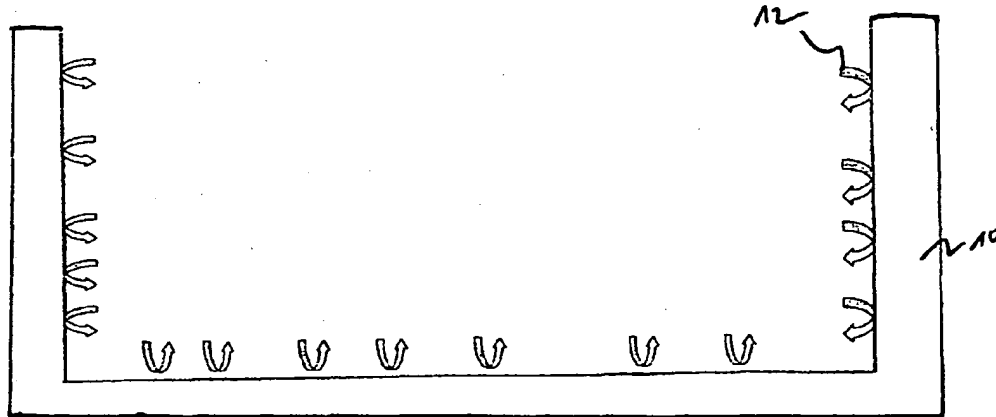
PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/056335 A2(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/543****HOCHTECHNOLOGIE E.V.** [DE/DE]; Winzerlaer Str.
10, 07745 Jena (DE).(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP02/14762**(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Dezember 2002 (27.12.2002)

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **LASSNER, Dirk** [DE/DE]; Brockhausstr. 27,
04229 Leipzig (DE). **UHLIG, Holm** [DE/DE]; Schkeu-
ditzer Str. 1, 04509 Delitzsch (DE).(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(72) Erfinder; und

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KÖHLER, Johann,**
Michael [DE/DE]; Untergasse 8, 07751 Golmsdorf (DE).
MAYER, Günter [DE/DE]; Fritz-Reuter Str. 16, 07745
Jena (DE).(30) Angaben zur Priorität:
101 64 577.5 31. Dezember 2001 (31.12.2001) **DE**(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-
nahme von US): **INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE**(74) Anwalt: **BOCK, Gerhard**; Patentanwaltsbüro Pfeiffer &
Partner, Winzerlaer Str. 10, 07745 Jena (DE).*[Fortsetzung auf der nächsten Seite]*(54) Title: MICRO-RECESS ARRAY FOR SIZE-DEPENDENT SORTING OR SEPARATION OF CELLS SUSPENDED IN A
FLOWING MEDIUM AND METHOD FOR ANALYSING THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF INDIVIDUAL CELLS(54) Bezeichnung: MIKROVERTIEFUNGSARRAY ZUR GRÖSSENABHÄNGIGEN SORTIERUNG ODER SEPARATION
VON IN EINER STRÖMENDEN FLÜSSIGKEIT SUSPENDIERTEN ZELLEN UND VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG
DER FUNKTIONELLEN AKTIVITÄT VON EINZELZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a micro-recess array for size-dependent sorting or separation of cells suspended in a flowing medium in individual reaction chambers, and to a method for analysing the functional activity of individual cells which are separated by said micro-recess array. The micro-recess array is characterised in that it comprises a cell array made of a microstructured solid phase with a plurality of recesses (10).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Mikrovertiefungsarray zur grössenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen in Einzelreaktionsräumen sowie ein Verfahren zur Untersuchung der funktionellen Aktivität von Einzelzellen, die mittels des Mikrovertiefungsarrays sortiert/separiert wurden. Das Mikrovertiefungsarray zeichnet sich dadurch aus, dass sie ein Zellarray aus einer mikrostrukturierten Festphase mit einer Vielzahl von Vertiefungen (10) umfasst.



(81) **Bestimmungsstaaten** (*national*): AU, JP, US.

(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Mikrovertiefungsarray zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen und Verfahren zur Untersuchung der funktionellen Aktivität von Einzelzellen

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung der funktionellen Aktivität von Einzelzellen an mikrostrukturierten Festphasenoberflächen und ein dafür eingesetztes Mikrovertiefungsarray. Die Erfindung findet
10 Einsatz in der medizinischen Diagnostik, Immunologie und Biotechnologie.

Es sind eine Reihe von Techniken verfügbar, mit denen der Nachweis von Sekretionsprodukten von nicht in Geweben organisierten Einzelzellen
15 oder aus Geweben isolierten Einzelzellen geführt werden kann. Weiter unten sind Techniken angeführt, die entwickelt wurden, um Zellen nach ihrer funktionellen Aktivität und der Produktion von Sekretionsprodukten zu typisieren und/oder zu sortieren. Außerdem sind Methoden angeführt, biologische Moleküle und Zellen in hoher Dichte in einem geeigneten
20 Muster auf Festphasen anzuordnen, was eine Grundlage der nachfolgend aufgezeigten Lösung darstellt.

Die Analyse mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) erlaubt die Detektion und Sortierung von Zellen im wesentlichen nach Oberflächen-
25 markern. Der Nachweis der funktionellen Aktivität von Zellen im Sinne der Messung von intrazellulären Produkten ist mittels Standardtechniken erst nach Permeabilisierung und Fixierung der Zellen möglich (Prussin 1997, Assemissen et al. 2001). Die Analyse einer großen Zellzahl ist mit dieser Technik in geringer Zeit möglich.

30 Die Miltenyi Technologie kann als eine Methode zur Zellseparation nach dem Kriterium der Produktion von Zellsekretionsprodukten (z.B. Zytokinen) angesehen werden. Sie erlaubt die Messung von Sekretionsprodukten von Einzelzellen mittels bifunktionalen Antikörpern, die einerseits auf
35 der Zelloberfläche binden, andererseits Sekretionsprodukte wie Zytokine binden. Die auf der Zelloberfläche gebundenen Sekretionsprodukte kön-

- 2 -

nen dann mittels geeigneter Markierung der Sekretionsprodukte in Sandwichtechnik nachgewiesen und der produzierenden Zelle zugeordnet werden (Manz et al. 1995, Assenmacher et al. 1998, Brosterhus et al. 1999). Die Technik erlaubt sowohl den Nachweis von Sekretionsprodukten, als
5 auch die Sortierung von Zellen nach ihren Sekretionsprodukten mittels magnetischer oder FACS-Sortierung. Es ist keine Permeabilisierung und Fixierung der Zellen erforderlich.

Die Analyse von Zellsekretionsprodukten mittels in-situ Detektion kann
10 ebenfalls mikroskopisch nach Zytozentrifugation mit Immunophänotypisierung erfolgen. Hierbei können die Sekretionsprodukte wie beim FACS nachgewiesen werden. Eine Fixierung und/oder Permeabilisierung der Zellen ist notwendig. Die Auswertung erfolgt mittels Mikroskopie.

15 Die ELI-Spot-Technik (Enzyme-linked-immuno-spot) zur Analyse von Zellsekretionsprodukten (im besonderen von B-Zellen produzierte Antikörper und von B- und T-Zellen, von antigenpräsentierenden Zellen produzierte Zytokine) erlaubt die Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer Sekretionsprodukte. Zellen werden dabei in Kulturkammern mit speziellen
20 Membranen kultiviert. Die Beschichtung der Membranen mit Liganden gegen Zellsekretionsprodukte erlaubt die Bindung von Sekretionsprodukten, die dann mittels Sandwichtechnik nachgewiesen werden können. Aufgrund der verwendeten Färbetechniken (typischerweise Peroxidase oder/und alkalische Phosphatase) sind allerdings nur Ein- bzw. Zwei-
25 farbmarkierungen möglich. Grundlage dieser Technik bilden vorrangig bis zu 96-well Plattensysteme mit speziellen Membransystemen als Plattengrundlage. Aufgrund der bisher verwendeten Plattensysteme ist nur ein relativ geringer Durchsatz von Zellen möglich und eine recht aufwendige Analyse erforderlich, da sich die Zellen in einem Zufallsmuster auf der
30 Membran anordnen.

Der Nachweis von Zytokinen kann ebenfalls geführt werden, wenn die Zellen in eine Matrix eingebettet werden, die die Diffusion der Sekretionsprodukte verhindert und die andererseits nachfolgende Detektionsschritte
35 zum Nachweis der Sekretionsprodukte erlaubt. Eine Sortierung von Zel-

len nach durchgeführtem Detektionsverfahren ist nach Lösung der Zellen aus der Matrix möglich (Turcanu und Williams 2001)

5 Arraysysteme werden zunehmend genutzt, um mittels miniaturisierter, definierter Anordnung von definierten Molekülen oder auch Zellen Ligand-Ligand-Interaktionen mittels Hochdurchsatzverfahren zu analysieren. Dabei sind bisher unterschiedlichste miniaturisierte Systeme für Molekülinteraktionen beschrieben worden (Genexpressionsarrays zur Übersicht siehe Deyholos und Galbraith 2001, Proteinarrays (Mac Beath und
10 Schreiber 2000), Antikörperarrays (de Wildt et al 2000). Zellspotarrays sind zur Messung von DNA-Expression beschrieben worden (Ziauddin und Sabatini 2001), allerdings nicht für die Einzelzellanalyse und nicht für die Detektion von Zellsekretionsprodukten an lebenden Zellen. In der Immunologie werden Arraysysteme von Peptidbibliotheken zur Messung
15 der Epitopeigenschaften von T-Zellen genutzt (Hiemstra et al. 2000, Tobery et al. 2001). Diese Systeme sind jedoch nicht mit dem in vorliegender Erfindung dargestellten System der Einzelzellcharakterisierung vergleichbar. Mikroelektrodenarrays mittels Halbleitertechnologie wurden verwendet, um die elektrische Aktivität von Zellen zu analysieren (Israel
20 et al. 1984, Connolly et al. 1990, Bhattacharjee 2000). Mikrostrukturierte Oberflächen anderer Autoren zur Positionierung von Zellen mittels Beschichtung von Zelladhäsionsmolekülen auf Festphasen erlauben eine Positionierung von Zellen, allerdings nicht in dem nachfolgend dargestellten Präzisionsmuster (Chen et al. 1998) und unterscheiden sich von dem im
25 folgenden dargestellten Prinzip der Sortierung grundlegend.

Nachteile der aufgeführten Techniken:

Bei dem Nachweis von intrazellulären Produkten ist die Permeabilisierung der Zellmembran und Zellfixation erforderlich, was die Aktivität der Zellen
30 beeinträchtigt und mit der Lebensfähigkeit der Zellen in vielen Fällen nicht vereinbar ist. Die Messung von zeitabhängigen, sequenziellen Prozessen ist für eine Gesamtzellpopulation, nicht jedoch für Einzelzellen möglich.

35 Die bisherigen Techniken erlauben eine Analyse von hohem Durchsatz, die Sensitivität der Methode ist jedoch von Kapazität der Ankermoleküle

- auf der Zelloberfläche abhängig, was die Bindungskapazität und Nachweisgrenze des Systems limitiert. Eine Analyse von zeitabhängigen sequentiellen Prozessen ist bei der Analyse mittels FACS-Technologie ebenfalls nur für die Gesamtpopulation, nicht für Einzelzellen möglich.
- 5 Eine Auswertung von derart markierten Zellen mittels Mikroskopie erlaubt zwar prinzipiell auch sequenzielle Vorgänge zu studieren, wird aber durch den geringen Durchsatz bei den bisher zur Verfügung stehenden Methoden limitiert.
- 10 Die Analyse eher geringer Zellzahlen und die Notwendigkeit der Permeabilisierung der Membran sind wesentliche Nachteile dieser Technik, weshalb sie sich für das Screening von Zellen außerhalb definiert wissenschaftlicher Fragestellungen nicht durchgesetzt hat.
- 15 Der ELI-Spot wird typischerweise nach Abwaschen der Zellen von der Membran durchgeführt. Die Enzymreaktionen führen zu einem nichtlöslichen Reaktionprodukt, das sich auf der Membran ablagert. Eine breitere Immuntypisierung der Zellen mit verschiedenen Markern ist bei den bestehenden Systemen nicht gegeben. Aufgrund der verwendeten Färbungsmethodik wird nur eine Ein- oder Zweifachmarkierung eingesetzt.
- 20 Die unstrukturierte Anordnung der Zellen auf der Membran erschwert die Auswertung des Assays. Daraus resultiert, dass der Assay nur bei einer relativ geringen Zelldichte sinnvoll ausgewertet werden kann. Weiterhin ist die Wiederfindungsrate stark limitiert.
- 25 Der Test nach Turcanu und Williams erfordert die Einbettung der Zellen in eine Matrix, was zusätzliche Arbeitsschritte erfordert und ein späteres Sortieren bzw. eine spätere Analyse erschwert. Bei diesem Test ist ebenfalls keine direkte strukturierte Anordnung der Zellen möglich.
- 30 Aufgrund der bestehenden Systeme (vgl. Genexpressionsarrays und Proteinarrays) ist eine Anordnung von Einzelzellen in einem festgelegten Muster und der Nachweis der Sekretionsprodukte dieser Zellen bisher nicht beschrieben worden. Eine strukturierte Anordnung von Zellen mittels Spotautomaten ist zwar prinzipiell denkbar, allerdings sehr aufwendig
- 35 und beim Einsatz von lebenden Zellen im Routinelabor sehr kostenintensiv.

siv. Dabei werden die Zellen oft physisch verletzt oder zerstört. Weiterhin basiert das Mikroarray-Prinzip in dem Aufbringen von Flüssigkeitstropfen auf eine feste Oberfläche. Diese Menge ist nicht beliebig reduzierbar (mindestens 100 nl) und somit ist das Spotten von Einzelzellen eher als
5 Zufall zu betrachten.

Die Nachteile der verschiedenen Systeme ergeben sich einerseits aus der Notwendigkeit, die Zellmembran zu manipulieren, andererseits die Umgebung der Zellen derart zu verändern, daß eine Detektion des sezernierten Produktes möglich wird. Weiterhin ist eine strukturierte Anordnung von Einzelzellen aufgrund der verwendeten Membranen schwierig, was
10 eine Auswertung des Systems erschwert und damit einhergehend notgedrungen die Dichte der zu untersuchenden Zellen verringert. Die Schwierigkeit, lebende Einzelzellen mittels Blottechniken auf Oberflächen anzuordnen liegt in der komplizierten technischen Lösung des Spotvorganges, der aus Zelldetektion und eigentlichem Spotvorgang mittels Hochpräzisionsmechanik bestehen muss.
15

Mittels der angestrebten Lösung sollen nicht in Geweben organisierte Einzelzellen oder aus Geweben isolierte Einzelzellen nach ihrer funktionellen Aktivität und der Produktion von Sekretionsprodukten typisiert werden. Der Vorgang der Zelltypisierung selbst soll die Vitalität der Zellen möglichst wenig beeinflussen. Es soll eine Lösung gefunden werden, die eine Anordnung von zu charakterisierenden Zellen in einem geeigneten Muster erlaubt, um einerseits eine hohe Zelldichte zu ermöglichen, andererseits die Auswertung der Markierung zu erleichtern. Die Zellen sollen ihre Position im Verlauf des Tests nicht verändern, um die Messung zeitabhängiger Prozesse zu erlauben. Die Zellen sollen sowohl aufgrund ihrer Oberflächenmarker, zellulärer Eiweiße, ihres genetischen
20 Materials (DNA, RNA), als auch ihrer Sekretionsprodukte bzw. Stoffwechselaktivität charakterisiert werden können.
25
30

Eine strukturierte Anordnung von Einzelzellen (die voneinander räumlich getrennt sein sollen) an einer strukturierten Festphase, würde einerseits
35 eine Hochdurchsatzanalyse erlauben, andererseits den Nachweis der Sekretionsprodukte an der Festphase aufgrund einer Immobilisierung ver-

- 6 -

bessern, von anderen Zellen aber getrennten Oberfläche erlauben. Bei Nutzung von Fluoreszenzmarkierung ist eine Mehrkanalanalyse möglich.

5 Die Aufgabe wird durch das Mikrovertiefungsarray zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen sowie das dazugehörige Verfahren zur Untersuchung der funktionellen Aktivität von Einzellzellen mit den in den Ansprüchen 1 und 18 genannten Merkmalen gelöst.

10 Das Mikrovertiefungsarray zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen zeichnet sich dadurch aus, dass das Mikrovertiefungsarray ein Zellarray aus einer mikrostrukturierten Festphase mit einer Vielzahl von Vertiefungen umfasst. Die Festphase besteht vorzugsweise zumindest teilweise aus Silizi-
15 um, Glas oder Kunststoff. Die Anordnung der Zellen in den Vertiefungen erfolgt durch Sedimentation aufgrund der Gravidität und Scherkräfte im Flüssigkeitsstrom, kann aber auch durch andere Hilfsmittel wie Magnetbeads, Anlegen eines elektrischen Feldes oder durch optische Manipulationen (z.B. optische Pinzetten) erfolgen. Die Zellen positionieren sich in
20 den entsprechenden Zonen auf der Festphase derart, dass sich in einer Vertiefung bestimmter Größe Zellen mit einer geringeren bis maximal gleichen Größe positionieren können.

25 In einer bevorzugte Ausgestaltung der Erfindung ist eine die Festphase des Zellarrays bedeckende Oberfläche vorgesehen, die insbesondere aus mikroskopierfähigen Glas besteht. Auf diese Weise kann eine spätere optische Auswertung der Zellsortierung, beispielsweise durch Fluoreszenzmikroskopie, besonders einfach und sicher durchgeführt werden. Ein Abstand zwischen einer Oberkante der Vertiefungen und der Glasplatte beträgt
30 vorzugsweise 10 µm bis 500 µm. Hierdurch können Turbulenzen im Flüssigkeitsstrom verhindert werden.

35 Weiterhin wird vorzugsweise eine möglichst dichte Anordnung der Vertiefungen auf der Festphase vorgegeben, so dass sehr große Anzahl von Zellen gleichzeitig vereinzelt und anschließend untersucht werden können. Dies kann insbesondere dadurch erreicht werden, dass die Vertiefun-

gen zueinander versetzt angeordnet sind und/oder eine Größe der Vertiefungen den zu untersuchenden Zellgrößen angepasst ist. Im letzteren Fall ist es bevorzugt, dass die Größe der Vertiefungen nur geringfügig größer, insbesondere 0,5 μm bis 5 μm größer, als die Zellgröße ist. Auch eine
5 Zelltiefe entspricht vorzugsweise der Zellgröße. Eine Dichte der Vertiefungen auf der Festphase beträgt weiterhin vorzugsweise bis zu 1.000.000 Vertiefungen pro cm^2 . Die genannten Maßnahmen tragen einzeln oder in beliebiger Kombination zur Erhöhung der Dichte an vereinzelter Zellen für die anschließende Untersuchung bei.

10 Ferner ist bevorzugt, dass die Festphase mit Antikörpern oder Antigenen beschichtet ist. Auf diese Weise lassen sich besonders einfach Untersuchungen an den Einzelzellen durchführen. Es versteht sich von selbst, dass die Vertiefungen auf dem Zellarray je nach Fragestellung der Unter-
15 suchung verschiedene Antikörper und/oder Antigene tragen können. So können insbesondere mehrere Antikörper und/oder Antigene in einer Vertiefung gebunden sein oder auch Regionen mit unterschiedlichen Antikörpern und/oder Antigenen auf dem Zellarray vorgegeben werden.

20 Bevorzugt ist weiterhin, dass die Festphase mit einem Gemisch aus Eiweißen und Antikörpern beschichtet ist. Das Eiweiß kann insbesondere Albumin sein, wobei insbesondere die direkt auf die Festphase aufgebrachte Beschichtung aus Albumin nachfolgend über Succinimidylester kovalent angebundene Antikörper trägt. Alternativ kann die Festphase
25 eine Beschichtung aus Polylysin mit nachfolgend angebundenen Antikörpern tragen. Die genannten Modifikationen haben sich als besonders praktikabel bei der Herstellung beschichteter Festphasen erwiesen und eignen sich zudem als Standardsystem für Untersuchungen. Wenn die Festphase aus Silizium ist, kann je nach angestrebter Applikation die Siliziumoberfläche
30 derart behandelt werden, dass sich deren Ladung und Hydrophobizität ändert. Damit ist das System auch in dieser Hinsicht variabel den jeweiligen Erfordernissen anpassbar.

Bei der Untersuchung der funktionellen Aktivität von Einzelzellen mit
35 einem Mikrovertiefungsarray findet in einem ersten Schritt eine Vereinzelung der Zellen und einem nachfolgendem Schritt eine Untersuchung

der funktionellen Aktivität der vereinzelter Einzellzellen statt. Die geordnete Vereinzelung einer Vielzahl von Einzelzellen ist ein wesentlicher Aspekt des Verfahrens und begünstigt erst den Erfolg der nachfolgenden Untersuchungen. Die Vereinzelung kann dabei durch Sortierung nach
5 Zellgröße und/oder Typisierung nach Zelltyp erfolgen. Ferner kann sie mit Hilfe von Latexpartikeln, Magnetbeads oder mittels optischer Pinzetten unterstützt werden. Die Maßnahmen erlauben erstmalig die parallele Untersuchung einer großen Anzahl von Einzelzellen hinsichtlich ihrer funktionellen Aktivität.

10

Als vorteilhaft hat sich dabei erwiesen, das Mikrovertiefungsarray mit einer Zellsuspension hoher Dichte, insbesondere von etwa 2×10^6 Zellen pro 100 μ l, zu beladen. Von einer solchen Zellsuspension werden vorzugsweise nur 10 bis 20 μ l in das Mikrovertiefungsarray aufgenommen.
15 Damit können bereits sehr kleine Probenmengen verarbeitet werden.

Nach dem Beladen wird das Mikrovertiefungsarray zur Entfernung nicht positionierter Zellen gespült. Ein Flüssigkeitsstrom beim Spülen beträgt dabei vorzugsweise 0,01 bis 0,3 ml pro Sekunde. Pro Spülzyklus wird
20 vorzugsweise eine Spülmenge von 1 bis 2 ml aufgegeben. Als besonders effektiv hat sich ein pulsartiges Beladen und Spülen herausgestellt. Die genannten Maßnahmen zur Probenaufbereitung haben sich als besonders geeignet für die Standardisierung des Prozesses erwiesen.

25 Demnach schlägt die vorliegende Erfindung vor, auf Silizium-, Kunststoff- oder Glasoberflächen mittels Ätz- oder Prägetechniken netzartig verteilte Vertiefungen in der etwaigen Grösse der zu untersuchenden Einzelzellen aufzubringen (Zellmikrovertiefungsarray). Die Vertiefungen dienen zur Aufnahme und damit der Anordnung von Einzelzellen. Wird eine Suspension/Lösung mit Einzelzellen auf den Array aufgebracht, lagern sich die
30 Zellen sowohl auf der nichtstrukturierten Oberfläche als auch in den Vertiefungen an. Nicht in Vertiefungen angeordnete Zellen können mittels Anlage eines Flüssigkeitsstromes von der Oberfläche abgewaschen werden. Die platzierten Zellen sekretieren bestimmte Stoffwechselprodukte, oder verändern ihre Umgebung durch bestimmte biochemische Prozesse.
35 Eine Beschichtung der Oberfläche des Zellarrays mit Antikörpern oder

anderen Liganden von Zellsekretionsprodukten erlaubt eine Bindung der Zellsekretionsprodukte oder beeinflusst die Aktivität der Zellen. Die sezernierten Stoffe oder die von den Zellen modifizierten Mikroumgebungen können durch Nachweisreaktionen mit (z.B. fluoreszenz-) markierten
5 Liganden (z.B. Antikörpersandwichtechnik) sichtbar gemacht werden.

Die funktionelle Charakterisierung von Einzelzellen (z.B. B-Zellen, T-Zellen, antigen präsentierende Zellen, endokrine Zellen, Tumorzellen) mittels des dargestellten Mikrovertiefungsarrays wird durch die Möglichkeit einer Mehrkanalanalyse für verschiedene Sekretionsprodukte und
10 Oberflächenmarker ermöglicht.

Das Array erlaubt auf einfache Weise die definierte Anordnung von sehr großen Zellzahlen, die im Verlaufe der Testphase ihre Positionen nicht
15 verändern. Es ist deshalb möglich, die Zellen einerseits aufgrund von Oberflächenmarkern zu charakterisieren, andererseits die Sekretionsprodukte dieser Zellen in ihrer unmittelbaren Umgebung nachzuweisen und zu messen, was eine sehr geringe Manipulation der zu charakterisierenden Zellen erfordert, andererseits in verschiedenen Nachweisschritten erfolgen
20 kann und dann der jeweiligen Vertiefung/respektive Zelle zugeordnet werden kann. Mittels der dargestellten Methode zur Bestimmung der Sekretionsprodukte einer Zelle ist eine zeitabhängige Charakterisierung von Einzelzellen und ein Nachweis der Sekretionsprodukte ohne die Alteration der Zellmembran dieser Zellen möglich.

25 Die Vorteile der vorgeschlagenen Lösung bestehen demnach noch einmal zusammenfassend darin:

1. Simultane Anordnung von Zellen in einer erhöhten Zelldichte (bis zu 1
30 Million Zellen/cm²) gegenüber konventionellen Zellspotverfahren.

2. Es ist eine geordnete Immobilisierung von Zellen möglich und damit auch eine hohe Detektionsrate durch optische Verfahren (z.B. Mikroskopie/Laserscanning-Mikroskopie, Immunfluoreszenzscanning-verfahren)
35 nach verschiedenartiger Behandlung (Spül- und Waschschrte) gegeben.

3. Durch die räumliche Separation der Einzelzellen können lokal getrennte Untersuchungen sehr vieler verschiedener Zellen (Lymphozyten, Makrophagen, zirkulierende Tumorzellen, Zelllinien) durchgeführt werden.

5

4. Zeitabhängige Prozesse können sequenziell an ein und derselben Zelle durchgeführt und analysiert werden (Echtzeitanalyse). Die Zunahme von Fluoreszenzsignalen bei stabilen Fluoreszenzmarkern und die Möglichkeit der Analyse von Bleicheffekten bei nichtstabilen Fluoreszenzmarkern kann zur Messung von zeitabhängigen Prozessen genutzt werden.

10

5. Eine parallele Untersuchung von Oberflächenmarkern von Zellen und Detektion ihrer Sekretionsprodukte ist möglich.

15

6. Quantifizierbarkeit der Sekretionsprodukte und Zuordnung zur sezernierenden Einzelzelle.

7. Untersuchung der Sekretionsfunktion bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen (Medium, Temperatur, Zellgifte, Hormone, Zytokine) ist durch die Möglichkeit des Wechsels der Zellmedien bei konstanter Zellposition gegeben.

20

8. Im Gegensatz zur ELI-Spot-Technik können aufgrund des Einsatzes von Fluoreszenzmarkern andere geeignete Detektionssysteme (konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, Laserscanning-Mikroskopie), aber auch Lumineszenzmarkierungen durchgeführt werden. Der Einsatz von Chemolumineszenz würde den beschriebenen Test hochsensitiv gestalten.

25

9. Die hohe Zellzahl bei der Analyse auf dem Zell-Array erlaubt eine gute statistische Auswertung der untersuchten Zellpopulation.

30

10. Die Immobilisierung der Zellen im Flüssigkeitsstrom ist durch vielfältige andere Methoden (Latexpartikel, Magnetbeads, optische Pinzetten) kombinierbar.

35

11. Die Untersuchung lebender Zellen erlaubt die anschließende Nutzung der Zellen in einem nachfolgenden Experiment (nach z.B. magnetischer Sortierung), oder nach Ablösung der Zellen mittels Stempeltechniken.

5 12. Aufgrund der starren Anordnung der Vertiefungen in der Festphase läßt sich der beschriebene funktionelle Test sequentiell mehrfach nacheinander und auch mit unterschiedlichen Zellen durchführen (Mehrfachnutzung der strukturierten Festphasen ist möglich).

10 13. Die Technik ist für die Charakterisierung von Einzellzellen in Aktivitäts-, Toxizitäts- und Kanzerogenitätstests mittels Hochdurchsatzscreening geeignet.

15 Es ist ein Verfahren zur funktionellen Charakterisierung von nicht in Geweben organisierten oder aus Geweben isolierten Einzelzellen sowie eine zugehörige Vorrichtung geschaffen worden. Dazu werden mikrostrukturierte Festphasen (z.B. Silizium, Glas, Plastik), auf denen Mikrovertiefungen aufgebracht sind, genutzt. In den Mikrovertiefungen können Einzelzellen in einem geeigneten Muster in einer sehr hohen Zelldichte (z.B. 20 150.000 pro cm^2) angeordnet werden. Auf einem derartigen Zellarray (microwell immuno chip) können Liganden gegen Sekretionsprodukte der Einzelzellen aufgebracht werden, die einen Nachweis der Sekretionsprodukte von Einzelzelle erlauben. Die Charakterisierung der Einzelzellen soll mittels Analyse ihrer Sekretionsprodukte erfolgen und kann aber 25 durch die Zelltypisierung mittels Oberflächenanalyse oder intrazellulären Markern erweitert werden. Eine Separation von Zellen nach erfolgter Analyse ist möglich.

30 Es steht eine Methode und eine Vorrichtung zur Vereinzelung von Partikeln/Zellen aus großen Populationen an mikrostrukturierten Festphasen und der nachfolgenden molekularen Typisierung der Zellen, wie genetischem Material oder Oberflächen- oder zellulären Eiweißen zur Verfügung.

35 Dabei können zur effektiven Separierung und Klonierung von Zellen lebende Einzelzellen aus großen Zellpopulationen vereinzelt, auf spezifi-

- 12 -

sche Eigenschaften untersucht und nach der Typisierung für nachfolgende Prozesse ausgewählt werden.

5 Ebenso kann zur lokal getrennten, sequentiellen Untersuchung separierter Zellen, wie der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen an Einzelzellen an mikrostukturierten Festphasen nach Separation aus großen Zellpopulationen durchgeführt werden.

10 Die Methode dient auch zum Nachweis der Sekretion isotypspezifischer oder antigenspezifischer Antikörper an vereinzelter B-Zellen mittels Mikrowellarray.

15 Die Nutzung des Mikrowellarrays zur Separation und späteren Screening von vereinzelter Hybridomazellen auf die Produktion antigenspezifische Antikörper ist möglich.

20 Die Methode ist geeignet zum Nachweis von sezernierten Enzymen an Einzelzellen, z.B. sezernierten Proteasen die von Tumorzellen gebildet werden, deren Enzymaktivität mittels Umwandlung spezifischer, immobilisierter Substrate an der Oberfläche der Mikrokavität nachgewiesen werden kann.

25 Der Einsatz der Mikrokavitäten für den Nachweis oberflächenbasierter enzymmediierter und/oder immunmediierter Zellreaktionen, auch für die Wechselwirkung unter verschiedenen Zellen ist möglich. Dazu werden die Kavitäten erst mit einem Zelltyp beladen. Danach werden andere Zellen hinzugespült und somit eine Doppelbeladung der Kavität erreicht. Somit lassen sich Zel-Zell-Interaktionen räumlich getrennt messen.

30 Es ist eine Methode zum Nachweis von Proliferation von Einzelzellen geschaffen. Nach der Separation einzelner Zellen in Mikrowellkavitäten kann die Proliferation von Zellen dahingehend untersucht werden, dass die Zellen nach Proliferation aufgrund des Zellwachstums die Kavitäten verlassen und dies entweder an der Oberfläche nachgewiesen werden
35 kann, oder mittels DNA Markern detektiert werden kann. Die Oberfläche kann mit stimulierenden, proliferationsfördernden Faktoren beschichtet

- 13 -

werden und der Effekt dieser Stoffe kann an vereinzelter Zellen untersucht werden.

5 Die Methode kann zur Selektion von Zellen, wenn durch Oberflächenbeschichtung spezifische Zellen hinsichtlich Vitalität oder Proliferation gefördert werden, oder gehemmt werden, oder gebunden werden und damit selektiv beeinflusst werden genutzt werden.

10 Die Separation von Einzelzellen aus großen Populationen zur späteren Untersuchung des genetischen Materials, wie DNA oder RNA ist möglich.

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel und anhand von Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen:

15 Figur 1 eine schematische Darstellung einer Vertiefung in der Festphase mit einer Beschichtung eines Liganden;

Figur 2 die Vertiefung der Figur 1 mit einer vereinzelter Zelle und Sekretionsprodukten;

20 Figur 3 die Vertiefung der Figur 2 nach dem Abwaschen nicht gebundener Sekretionsprodukte;

Figur 4 die Vertiefung der Figur 3 nach Markierung mittels Markern;

25 Figur 5 die Vertiefung der Figur 4 nach Entfernung der Zelle und Behandlung mit markierten Liganden und

30 Figur 6 die Vertiefung der Figur 4 nach Behandlung mit markierten Liganden.

35 Die Vereinzelung und Untersuchung von Zellen mittels der mikrostrukturierten Festphase, aus der zur Veranschaulichung in den Figuren 1 bis 6 jeweils nur eine Vertiefung 10 herausgegriffen wurde, kann folgendermaßen durchgeführt werden:

Beschichtung der Festphase

Die Festphase aus Silizium wird, wie hier schematisch angedeutet, im Bereich der Vertiefung 10 mit Antikörpern 12 gegen Sekretionsprodukte (z.B. Zytokinassay) oder mit Antigenen zum Nachweis eines zu messenden Sekretionsproduktes beschichtet (Figur 1). Aufgrund der Oberflächeneigenschaften von Silizium können einerseits Antikörper gegen Sekretionsprodukte wie Zytokine direkt adsorbiert werden, andererseits können Antikörper 12 in einem Gemisch mit anderen Eiweißen wie Albumin gemeinsam beschichtet werden. Als sinnvoll hat sich weiterhin die direkte Beschichtung mit Albumin und die nachfolgende kovalente Bindung der Antikörper über Succinimidylester erwiesen.

Weiterhin ist eine Bindung von Protein A an die Siliziumoberflächen möglich, an das dann Antikörper gebunden werden können. Versuche haben gezeigt, dass eine optimale Lösung gefunden werden muss, um einerseits eine hohe Ligandendichte zu erreichen, der Ligand seine Bindungsaktivität beibehalten soll und die unspezifische Bindung von Zellen möglichst gering sein soll. So erlaubt die direkte Adsorption von Antikörpern zwar eine hohe Bindung, die gebundenen Antikörper verlieren aber einen wesentlichen Anteil ihrer Bindungsaktivität (Denaturierung). Nach Beschichtung der Oberfläche mit Polylysin wird eine gute Bindungsdichte von Antikörpern erreicht, die eine gute funktionelle Aktivität aufweisen, die so beschichtete Oberfläche weist allerdings auch eine sehr hohe Bindungskapazität für Zellen auf.

Blockierung der Festphase

Die weitere Oberfläche des Zellarrays wird mit einem für den Test irrelevanten Protein wie Albumin blockiert, um die verbleibenden Bindungsstellen auf der Siliziumoberfläche für Proteine zu blockieren und die Adhäsion für Zelloberflächenproteine zu minimieren.

Beladung mit Zellen

Die Mikrovertiefungsarrays werden mit einer Zellsuspension von etwa $2 \cdot 10^6$ Zellen pro 100 µl beladen. Für die eigentliche Beschichtung sind 10-20 µl ausreichend. Je nach Totvolumen des verwendeten Systems müssen die Volumina angepasst werden. Die Anordnung der Zellen er-

- 15 -

folgt durch die Gravidität im Flüssigkeitsstrom, kann aber auch durch andere Hilfsmittel wie Magnetbeads, Anlegen eines Magnetfeldes oder optische Manipulationen (z.B. optische Pinzetten) erfolgen bzw. durch diese Methoden verstärkt werden. Die Zellen positionieren sich entsprechend ihrer Größe in die vorbereiteten Vertiefungen ähnlicher Größe. Ziel ist das Erreichen einer möglichst hohen Zelldichte, wobei eine möglichst hohe Zahl von Mikrovertiefungen mit nur einer Zelle gefüllt sein sollen. Erreicht wird diese Zelldichte sowohl durch eine hohe Zelldichte in der Zellsuspension (siehe oben), durch eine möglichst dichte Anordnung der Mikrovertiefungen, durch die Anordnung der Mikrovertiefungen in speziellen, z.T. versetzten Mustern selbst, durch eine der Zellgröße angepasste (nur geringfügig ($0,5-5\ \mu\text{m}$) größere Mikrovertiefungen als die Zellgröße), durch die Form der Mikrovertiefung (Zelltiefe sollte der Zellgröße entsprechen), durch die Oberflächeneigenschaften (Ladung, Hydrophobizität) der Oberfläche. Das Anlegen eines Magnetfeldes oder Einsatz optischer Verfahren kann das Festhalten oder Plazieren der Zellen in den Vertiefungen sichern oder unterstützen.

Abwaschen nicht positionierter Zellen

Nicht in den Vertiefungen positionierte Zellen werden nach Anlage eines geeignet starken Flüssigkeitsstromes wieder entfernt. Bei Waschschritten sollte einerseits das Auswaschen von in den Vertiefungen befindlichen Zellen durch Wirbelbildung vermieden werden, andererseits eine Schädigung der Zellen durch einen massiven Flüssigkeitsstrom. Strömungsraten von $0,3-0,01\ \text{ml pro Sekunde}$ haben sich als sinnvoll herausgestellt. Von wesentlicher Bedeutung für das Vermeiden von Verwirbelungen und damit dem Herauswaschen von Zellen ist der Abstand zwischen der Oberkante der Vertiefungen und einer mikroskopierfähigen z.B. Quarzglasoberfläche. Bei Abständen ab $500\ \mu\text{m}$ treten sehr starke Verwirbelungen auf, bei Abständen unter $10\ \mu\text{m}$ ist der Flüssigkeitsstrom mit Zellen stark beeinträchtigt. Mehrfache, pulsartige Beladungs- und Waschzyklen erhöhen die Dichte und die Effektivität der Beladung. Die Waschschriffe sind ebenfalls in pulsartigen Zyklen effektiv. Waschmengen von insgesamt $1-2\ \text{ml}$ sind bei pulsartigem Waschen ausreichend. Eine Anreicherung der Waschlösung mit Zellkulturmedium oder Eiweiß (Albumin $0,1-1\%$) erhöht die Vitalität der Zellen während des Tests.

- 16 -

Inkubation der Zellen

Die Zelle 18 wird mit einem Kulturmedium auf dem Zell-Array inkubiert, um die Vitalität der Zelle 18 zu erhalten und eine Sekretion von Stoffwechselprodukten 14, 16, z.B. Zytokine beim Zytokinassay oder Antikörper bei B-Lymphozyten, in die Umgebung zu bewirken (Figur 2). Die Stoffwechselprodukte 14, 16 werden durch die immobilisierten Antikörper 12 oder gegebenenfalls Antigene gebunden oder verändert (z.B. im Fall von Enzymen) auf andere Art die anfängliche Beschichtung der Oberflächen. Eine Inkubation sollte 1-72 h zu erfolgen, um einerseits die Stoffwechselprodukte 14, 16 nachweisen zu können, andererseits, Verfälschungen durch Zelltod und Zellteilungen zu vermeiden. Bestimmte Zelltypen wie Makrophagen haben die Tendenz, ihre Position aktiv zu verändern, was das Ergebnis beeinträchtigt, andere Zelltypen wie Lymphozyten behalten ihre Position über Stunden bei.

Spülen der Festphase

Der gesamte Kammerinhalt wird mehrfach mit Waschlösungen gespült um ungebundene Stoffwechselprodukte 14, 16 abzuspielen (Figur 3). Die nachzuweisenden Sekretionsprodukte 14 binden sich an den auf der Festphasenoberfläche gebundenen Antikörper 12. Die Waschbedingungen sind dabei wie oben beschrieben zu wählen. Eine Variation von Spülfluss und des Abstandes zwischen Mikrowelloberkante und Kammeroberfläche kann genutzt werden, um unfixierte Zellen gegebenenfalls abzuspielen.

Inkubation von Markern

Der Zell-Array wird mit farbmarkierten Antikörpern 20 inkubiert, die sich gegen Oberflächenantigene der Zelle 18 richten. Die Färbung der antigenpositiven Zelle 18 erfolgt durch direkte bzw. indirekte Markierung. Die Konzentration der Antikörper 20, 22 richtet sich nach für die Fluoreszenzmikroskopie üblichen Verdünnungen. Gegebenenfalls kann die Oberflächenmarkierung der Zelle 18 auch vor dem Auftragen auf den Zell-Array erfolgen. Die Markierung der Zelle 18 kann nach Permeabilisierung der Zellmembran auch durch Antikörper 22 gegen zytosolische oder andere Antikörper oder weitere Farbstoffe erfolgen (z.B. DAPI oder Propidiumjodid für Zellkerne/Nukleinsäuren). Es können Vitalfarbstoffe verwenden

- 17 -

det werden, um die Vitalität der Zellen für jede einzelne Zelle während des Test abzuschätzen. Aufgrund der geringen Volumina, die zum Beschichten des Vertiefungsarrays notwendig sind (10-20 µl), sind geringe Reagenzienmengen erforderlich.

5

Der gesamte Kammerinhalt wird mehrfach mit Waschlösungen gespült, um die überschüssigen Antikörper 20, 22 abzuspielen.

Untersuchung

10 Zur Untersuchung folgt ein Mikroskopiervorgang des Zell-Arrays nach verschiedenen Fluoreszenzen (grün z.B. FITC, rot z.B. Texas Rot, blau z.B. DAPI, weiß z.B. Fotolumineszenz). Ein Laser-Scanning-Mikroskop ist dahingehend geeignet, da dieses Messverfahren eine hohe Durchsatzrate mit einer hohen Sensitivität für die Zellmarker besitzt. Andererseits
15 treten innerhalb der Mikrovertiefung eine Reihe von Reflexions- und Streulichte effekten auf, die zur Auswertung herangezogen werden können und die die Sensitivität erhöhen können. Ein nicht konfokaler Messmodus ist auch deshalb sinnvoll, weil ein Großteil der Vertiefungsoberfläche die zur Messung genutzt werden kann (4/5) in der Vertikalen angeordnet ist,
20 damit nahezu nur zu Reflexions- und Streulicht führt was bei konfokaler Messung dann nahezu ausgeblendet werden würde. Bei einer 50fachen Mikroskopvergrößerung können bei 10 µm Mikrowellgröße etwa 14000 Vertiefungen gleichzeitig analysiert werden.

25 Beim Waschen des Arrays besteht die Möglichkeit der Entfernung der verbliebenen und gegebenenfalls markierten Zelle 18. In der Figur 5 erfolgt der Nachweis eines Stoffwechselproduktes 14 ohne und in der Figur 6 in Anwesenheit der Zelle 18. Zur Ablösung von durch Magnetbeads festgehaltenen Zellpopulationen muß gegebenenfalls das Magnetfeld ge-
30 ändert werden. Änderungen der Flußraten können, wie beschrieben genutzt werden. Um Signale aus der Zellmarkierung auszublenden und den jeweiligen Kanal für weitere Messungen mehrfach zu verwenden, kann der Fluoreszenzfarbstoff mit kurzzeitigem hochdosiertem UV-Licht gebleicht werden.

35

- 18 -

Im Beispielfall der Figuren 4, 5 und 6 hat es eine Ablagerung von zellspezifischen Stoffwechselprodukten 14 gegeben. Die Detektion der Sekretionsprodukte 14 erfolgt im Beispiel der Figuren 5 und 6 durch Inkubation des Zellarrays mit weiteren fluoreszenzmarkierten Liganden 24 gegen das Stoffwechselprodukt 14, z.B. weiteren Antikörpern, die ein anderes Epitop als die primären Antikörper besitzen, die zur Bindung des Stoffwechselproduktes 14 verwendet werden. Es sind einerseits monoklonale Antikörper möglich, die verschiedene Epitope erkennen, oder die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers zu Bindung und eines polyklonalen zur Detektion.

Nach dem Nachweis wird das Zellarray zur Entfernung überschüssiger Antikörper gewaschen.

Weitere Mikroskopierschritt zur Detektion anderer Sekretionsprodukte können sich anschließen.

Es folgt eine Analyse der Signalintensitäten der jeweiligen Mikroskopierschritte und Zuordnung der Oberflächenantigen-negativen/positiven Zellen zu den Signalen der gemessenen entsprechenden Sekretionsprodukte. Die Kombination der verschiedenen Messungen in den verschiedenen Farbkanälen erlaubt eine Charakterisierung der funktionellen Aktivitäten der einzelnen Zellen. Durch Mehrfarbfluoreszenz können die Sekretionsprodukte auch ohne Entfernung der Zellen nachgewiesen werden.

Weitere Mikroskopierschritte zur Detektion von Hintergrundsignalen und zur zeitabhängigen Analyse sind möglich. Zellen können nach den Scanvorgängen mittels spezieller Stempel aus dem Vertiefungsarray entfernt werden und weiteren Analysen zugeführt werden.

Nachfolgend soll ein spezielles Beispiel beschrieben werden:
Beschichtung der Oberfläche mit 100 µl 1mg/ml Gliadinlösung für vier Stunden, Waschen mit PBS, 1%Rinderserumalbumin, Blockieren mit 10% Rinderserumalbuminlösung für eine Stunde. Waschen mit PBS/1%Rinderserumalbumin, Beladen des Vertiefungen (16 µm) mit einem B-Lymphozytenhybridom, das IgG Antikörper gegen Gliadin produ-

- 19 -

ziert. Waschen überschüssiger Zellen, Inkubation der Zellen für zwölf Stunden in RPMI1640 (Zusätze 10%FCS, Penicillin, Streptomycin, Mercaptoethanol). Permeabilisieren der Zellen, Inkubation mit DAPI (0,001 mg/ml PBS) zum Nachweis mit Zellen beladener Vertiefungen für
5 zehn Minuten, Waschen, erster Mikroskopierschritt. Mehrfache ausgiebige Waschschriffe zum Herauswaschen der Zellen aus den Vertiefungen. Inkubation mit Anti-IgG Fluoreszin markiertem Immunglobulin für eine Stunde (DAKO Anti-Maus IgG, polyclonal, 1:50). Waschschriffe. Zweiter Mikroskopierschritt zum Nachweis gebundenem Anti-Gliadin Immunglobulin-Anti-Maus-IgG Komplexen. Alle Waschschriffe mit PBS,
10 0,1%Rinderserumalbumin, wiederholte Pulse von etwa 300 µl Waschlösung über fünf Minuten.

Weitere Mikroskopierschritte zur Detektion von Hintergrundsignalen und zur zeitabhängigen Analyse sind möglich. Zellen können nach dem jeweiligen Scanvorgang mittels spezieller Stempel von der Oberfläche entfernt werden und einer weiteren Analyse zugeführt werden. Die Charakterisierung der Einzelzellen aufgrund ihrer Sekretionsprodukte kann aber durch die Zelltypisierung mittels Oberflächenanalyse und/oder mittels intrazellulärer Markern erweitert werden. Die Separation von Zellen nach der
20 Analyse kann durch den Einsatz magnetischer Beads oder andere physikalische Prinzipien wie Stempeltechniken oder lasergesteuerte Auslenkung ("optische Pinzetten") von Zellen erfolgen.

Bezugszeichenliste

10	-	Vertiefungen
12	-	Antikörper
14; 16	-	Stoffwechselprodukte
18	-	Zellen
20	-	farbmarkierten Antikörper
22	-	Antikörper gegen zytosolische oder andere Antikörper
24	-	Liganden

Patentansprüche

1. Mikrovertiefungsarray zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikrovertiefungsarray ein Zellarray aus einer mikrostrukturierten Festphase mit einer Vielzahl von Vertiefungen (10) umfasst.
2. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine die Festphase des Zellarrays bedeckende Oberfläche, insbesondere aus mikroskopierfähigen Glas, vorhanden ist.
3. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Abstand zwischen einer Oberkante der Vertiefungen (10) und der Oberfläche 10 µm bis 500 µm beträgt.
4. Mikrovertiefungsarray nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass eine möglichst dichte Anordnung der Vertiefungen (10) auf der Festphase vorgegeben ist.
5. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen (10) zueinander versetzt angeordnet sind.
6. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass eine Größe der Vertiefungen (10) einer Zellgröße angepasst ist.
7. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Vertiefungen (10) nur geringfügig größer, insbesondere 0,5 µm bis 5 µm größer, als die Zellgröße ist.
8. Mikrovertiefungsarray nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Zelltiefe der Zellgröße entspricht.

- 22 -

9. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelltiefe so vorgegeben ist, dass zwei Zellen aufgenommen werden können (Doppelbeladung).
- 5 10. Mikrovertiefungsarray nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass eine Dichte der Vertiefungen (10) bis zu 1.000.000 pro cm^2 beträgt.
- 10 11. Mikrovertiefungsarray nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase aus Silizium, Glas oder Kunststoff besteht.
- 15 12. Mikrovertiefungsarray nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase mit Antikörpern (12) oder Antigenen beschichtet ist.
- 20 13. Mikrovertiefungsarray nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase mit einem Gemisch aus Eiweißen und Antikörpern (12) beschichtet ist.
- 25 14. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Eiweiß Albumin ist.
- 30 15. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase eine direkte Beschichtung aus Albumin mit nachfolgend über Succinimidylester kovalent angebundenen Antikörpern (12) trägt.
- 35 16. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase eine Beschichtung aus Polylysin mit nachfolgend angebundenen Antikörpern (12) trägt.
17. Mikrovertiefungsarray nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase aus Silizium ist und die Siliziumoberfläche derart behandelt ist, dass sich deren Ladung und Hydrophobizität geändert hat.

- 5 18. Verfahren zur Untersuchung der funktionellen Aktivität von Einzelzellen mit einem Mikrovertiefungsarray nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass in einem ersten Schritt eine Vereinzelung der Zellen (18) und einem nachfolgendem Schritt eine Untersuchung der funktionellen Aktivität der vereinzelter Zellen (18) stattfindet.
- 10 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Vereinzelung eine Sortierung nach Zellgröße erfolgt.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Vereinzelung eine Typisierung nach Zelltyp erfolgt.
- 15 21. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Vereinzelung mit Hilfe von Latexpartikeln, Magnetbeads oder mittels optischer Pinzetten unterstützt wird.
- 20 22. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikrovertiefungsarray mit einer Zellsuspension hoher Dichte beladen wird.
- 25 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikrovertiefungsarray mit einer Zellsuspension einer Dichte von etwa 2×10^6 Zellen pro 100 μl beladen wird.
- 30 24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikrovertiefungsarray mit 10 bis 20 μl der Zellsuspension beladen wird.
- 35 25. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikrovertiefungsarray nach dem Beladen zur Entfernung nicht positionierter Zellen gespült wird.

- 24 -

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass ein Flüssigkeitsstrom beim Spülen 0,01 bis 0,3 ml pro Sekunde beträgt.
- 5 27. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass eine Spülmenge pro Spülzyklus 1 bis 2 ml beträgt.
28. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Beladen und Spülen pulsartig erfolgt.
- 10 29. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung sequentiell erfolgt.
30. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung mittels Fluoreszenzspektroskopie erfolgt.
- 15 31. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass lokal getrennte Untersuchungen erfolgen.
- 20 32. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass eine Separation der Zellen (18) nach Abschluss der Untersuchung erfolgt.
- 25 33. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten (14) der Zellen (18) lokal definiert bestimmt wird.
- 30 34. Verfahren nach den Ansprüchen 18 und 33, dadurch gekennzeichnet, dass eine Zuordnung zu jeder vereinzelter Zellen (18) erfolgt.
- 35 35. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Einfluss der gesamten Zelle (18) auf die Umgebung gemessen wird.
36. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Stoffwechselaktivität der Zellen gemessen wird.

- 25 -

37. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass Vergleichsmesungen zweier Zellen erfolgen.
- 5 38. Verfahren nach den Ansprüchen 18 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen (18) über Stunden in Nährlösung inkubiert werden.

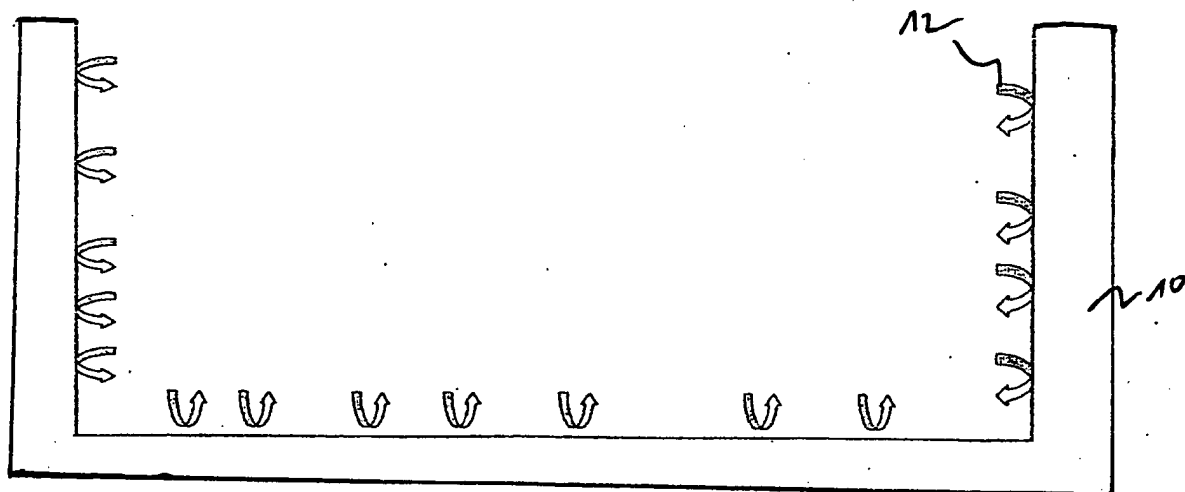


Fig. 1

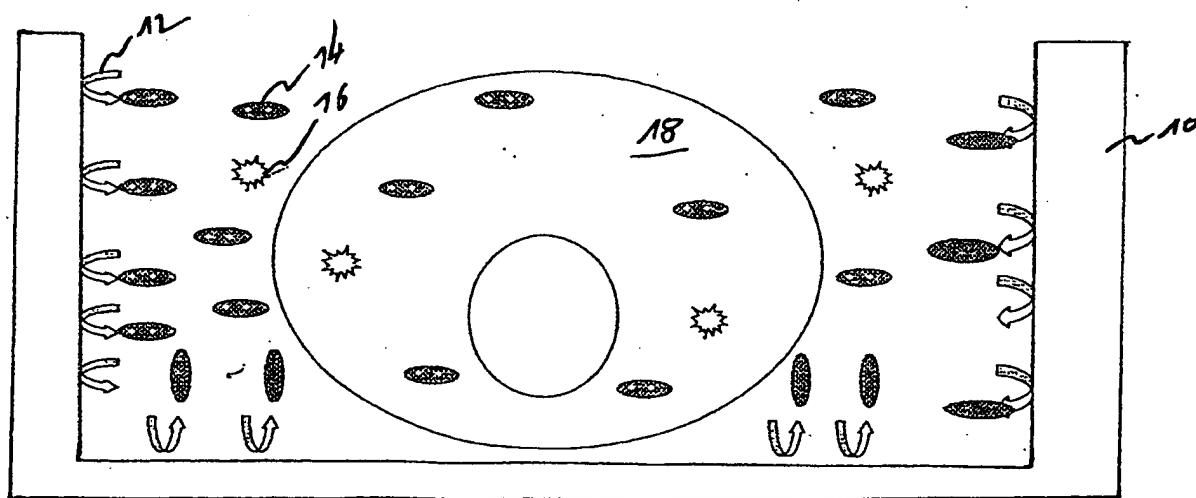


Fig. 2

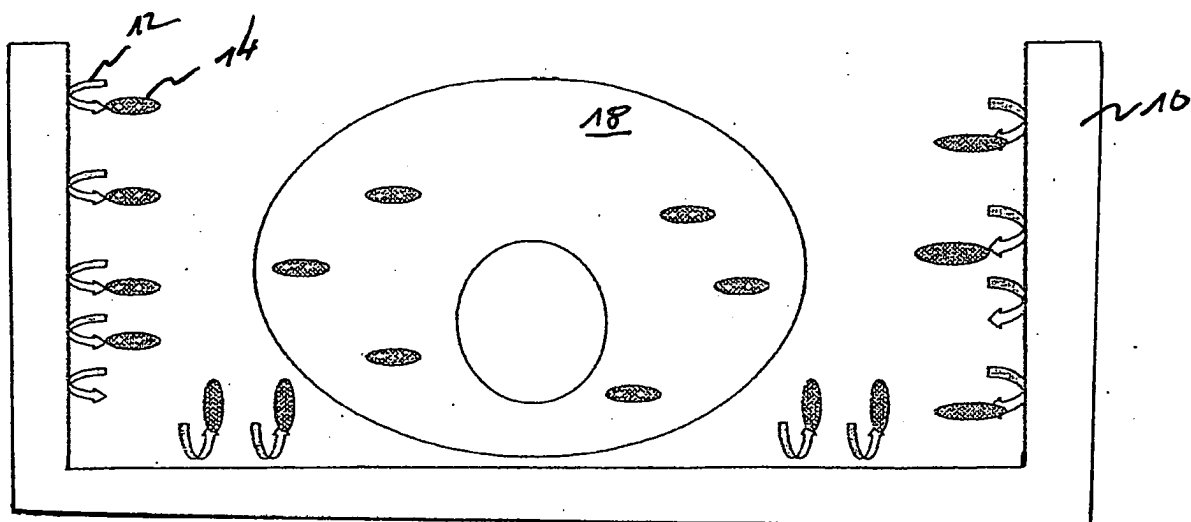


Fig. 3

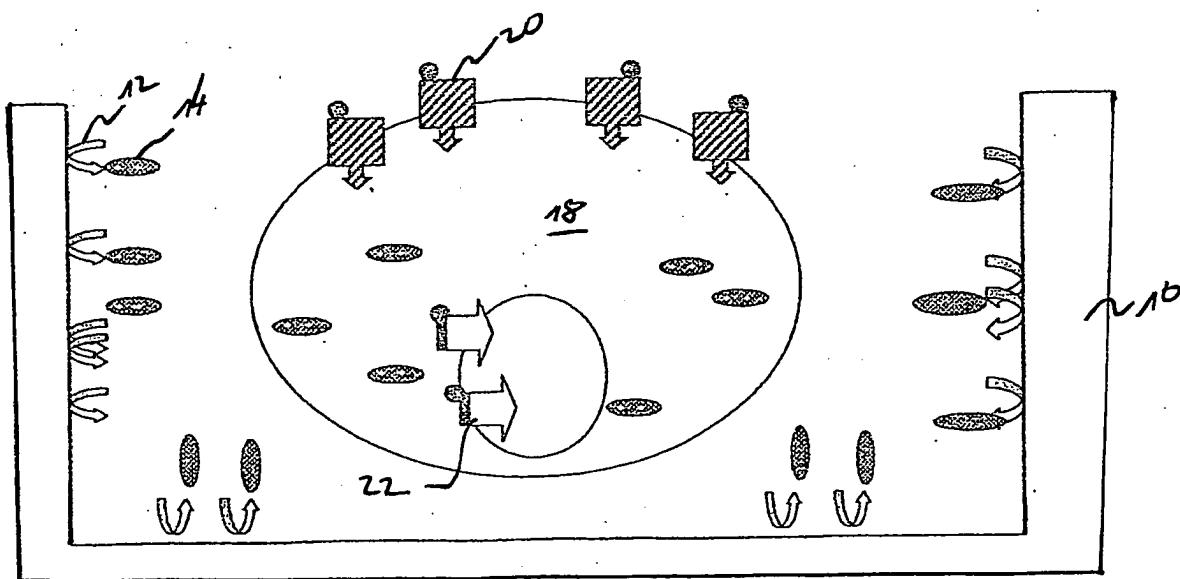


Fig. 4

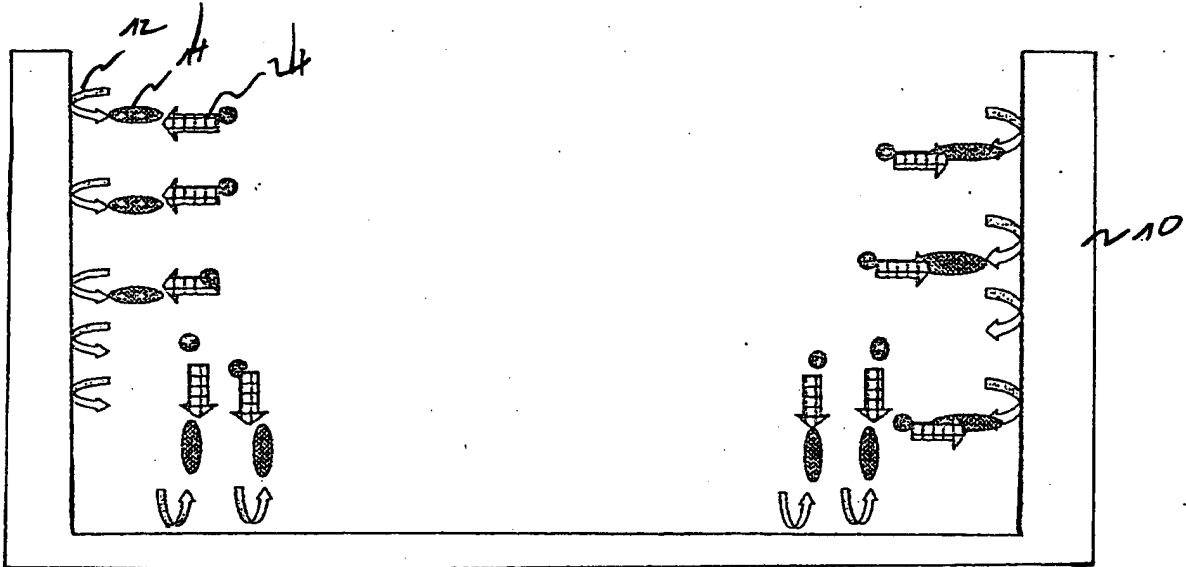


Fig. 5

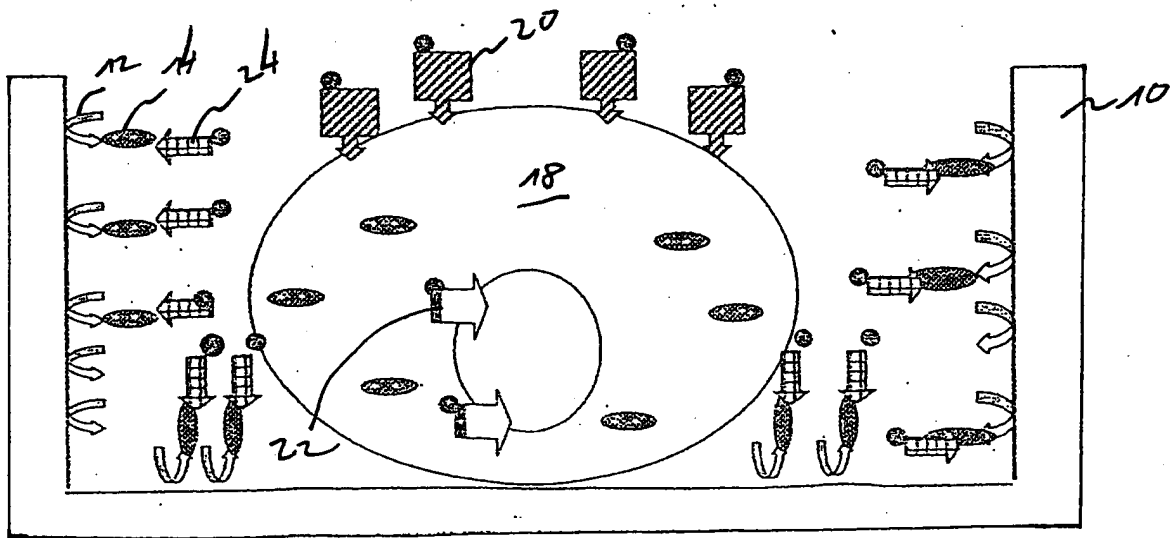


Fig. 6